Inducción de triploides por shock térmico en *Oncorhynchus mykiss* «trucha arco iris» en el Centro Piscícola de Motil, La Libertad, Perú

Triploid induction by thermal shock in *Oncorhynchus mykiss* «trout rainbow», Motil Piscicola Center, La Libertad, Perú

Esther Fernández-Chumbe, Radigud Fernández, Zulita Prieto
Facultad de ciencias Biológicas,Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, PERÚ.
rose_chumbe@hotmail.com; zapl99@yahoo.com.

Gilmer Castillo, Bianny Rodríguez
Ministerio de la Producción - Acuicultura. *gilmeramador@yahoo.com*

Liz Vargas
Facultad Ingenieria Agroindustrial, Universidad de Nacional de San Martin, PERÚ.
limavadi79 @hotmail.com

Resumen

Utilizando shock térmicos calientes hemos logrado obtener progenies triploides de *Oncorhynchus mykiss* «trucha arco iris». Se ha comprobado, en el caso de esta especie dulceacuícola, que además de los tres factores que habitualmente se consideran en la optimización del método de inducción de triploidia (periodo de incubación, intensidad del tratamiento y duración del mismo), hay que considerar otros parámetros como el oxigeno y la temperatura del agua del tratamiento. El tratamiento de mayor efectividad para inducir triploidia en la «trucha arco iris» consiste en aplicar shock térmicos de 28ºC durante 5 minutos de exposición inmediatamente después de la fecundación.

Palabras clave: Triploides, shock térmico, *Oncorhynchus mykiss,* trucha arco iris.

Abstract

Using warm thermal shocks we have obtained offsprings triploids of *Oncorhynchus mykiss* «trout rainbow». It has been verified, in case of this species, that besides the three factors that habitually are considered in the optimization of the method of induction of triplody (period of incubation, intensity of treatment and duration of the same) it is necessary to consider other parameters as oxygen and the temperature of the water treatment. The treatment of greater effectiveness to induce triploids in the "trout rainbow" consists of immediately applying shock thermal of 28°C during 5 minutes after the fertilization.

Key words: Triploids, thermal shock, *Oncorhynchus mykiss*, trout rainbow.

Introducción

En el cultivo de especies de peces se presentan comúnmente problemas que afecta la maduración gonadal, diferencias en el desarrollo de hembras y machos, que trae como consecuencia la disminución de la tasa de crecimiento, el deterioro en la calidad de la carne y alta mortalidad (Lozano *et. al*, 1987).

Un método eficaz para reducir las diferencias en la tasa de crecimiento de hembras y machos, es la inducción de esterilidad en los individuos, con lo cual se consigue la redistribución de energía que se utiliza en el proceso de desarrollo y madurez gonadal para incrementar el crecimiento somático (Utter *et, al.* 1982; Thorgaard, 1986; Ihseen *et al.,* 1991; Hussain, 1996).

Un método de producir esterilidad es la obtención de peces triploides, de gran interés en la producción acuícola, debido a su tasa de crecimiento superior al de

los diploides (Thorgaard,1986; Lozano,1989). La inducción de triploides se ha llevado a cabo mediante la aplicación de distintos tratamientos a ovas recién fecundados, pudiendo ser físicos, como los *shock* térmicos (fríos o calientes), *shock* de presión, o tratamientos químicos. Todos ellos, tienen como finalidad de impedir la formación y eliminación del segundo corpúsculo polar del huevo recién fecundado, de tal manera que por retención del juego cromosómico, el gameto femenino tiene un doble juego cromosómico (Tave, 1993; Purdom,1993).

En los peces, *shock* térmicos fríos son menos efectivos (Lincoln *et al.*, 1974; Lozano *et al.*, 1987b). En el caso de utilizar *shock* térmicos calientes en la producción de triploides, se ha comprobado que el éxito de las experiencias depende de tres factores fundamentales: intensidad del *shock* térmico, tiempos de exposición y de incubación. En el presente trabajo se han encontrado triploides con la aplicación de shock térmico caliente en ovas de fecundación temprana después de 45 minutos.

Material y métodos

El trabajo se realizó en el Centro Piscícola de Motil – Otuzco y en el Laboratorio de Genética de Poblaciones de la Universidad Nacional de Trujillo. Para dicha experiencia se seleccionaron como reproductores, 90 machos con 1620g de peso promedio y 45 hembras con 1600g de peso promedio, las que arrojaron 1145 ovas/ Kg. Los reproductores aptos para desovar se almacenaron en jaulas de madera forrado con paño anchovetero de 2,20 cm. x 0,90 cm. x 1,20 cm.

Obtención de gametos: Previo al inicio del proceso de desove, se suspendió la alimentación por 48 horas a fin de evitar la contaminación de la ovas con las heces durante el desove. En la extracción de fluidos sexuales para realizar la fecundación, se utilizó la proporción de dos hembras por macho.

Fecundación: Las ovas fueron colocadas en un colador plástico, se lavaron con una solución salina, y depositados en un recipiente de porcelana; con ayuda de una pluma de ave lo más delicadamente posible, se realizaron movimientos circulares. Se dejó 10 minutos en la oscuridad cubriendo el tazón con un saco de polietileno negro; transcurrido el tiempo se agregó agua a temperatura ambiente para hacer resistente a la membrana finalizando con el cierre del micrópilo.

La metodología descrita corresponde al método mixto el cual asegura una apertura del lumen del micrópilo de la ova por más tiempo y una mayor vitalidad de los espermatozoides.

Shock térmico: Después de realizada la inseminación artificial, se llevó a cabo el proceso de triploidización mediante la aplicación del *Shock* térmico dentro de los 45 minutos luego de la fecundación de las ovas. Se han efectuado los siguientes tratamientos: T1:26ºC 5'de exposición y 10 minutos de hidratación; T2: 28ºC 5' exposición y 10 minutos de hidratación; T3: 30ºC 5' de hidratación y 3 minutos exposición con un grupo control a temperatura ambiente.

Las ovas se pusieron dentro de vasos graduados en los que se mantuvieron suspendidos dentro del baño maría con el objeto de recibir el *Shock* térmico de acuerdo a los tratamientos establecidos. Acto seguido se trasladaron a los bastidores diseñados para el desarrollo embrionario. Luego de 28 días aproximadamente - en la fase de ojos - se cuantificó el número de individuos muertos en cada tratamiento.

Posterior al proceso de la embriogénesis, la ploidía fue determinada en la fase juvenil a los cinco meses de edad. Se utilizó el método de goteo de suspensiones celulares propuesto por Rivlin *et al.* (1985), Prieto & Fernández (1990) de la siguiente manera: se inyectó a los ejemplares una solución de colchicina a 0.2 % vía intramuscular a razón 0.5m/10g de peso durante veinte horas. Se dió muerte al espécimen y se procedió a extraer el tejido renal anterior, se colocó en una luna reloj conteniendo solución hipotónica de KCl 0,75 M, seguidamente se disgregó el tejido con ayuda de pinzas y estiletes. Luego con una pipeta Pasteur se paso a un tubo de centrífuga realizándose una suspensión suave para luego dejarlo en reposo por 45 minutos a temperatura ambiente. Luego de este tiempo se centrifugó a 800 r.p.m. durante 10 minutos; se descartó el sobrenadante y se agregó el fijador (alcohol etílico absoluto, ácido acético

glacial en proporción de 3:1) y se dejó en reposo por 10 minutos; luego se procedió a un segundo enjuague y se centrifugó por 8 minutos; después se descartó el sobrenadante y se agregó el fijador. Se tomaron pequeñas muestras con la ayuda de una pipeta Pasteur y se procedió a gotear sobre láminas portaobjeto limpias a una altura promedio de 20 cm, y se dejó secar al ambiente.

La coloración de las laminas se realizó con Giemsa (sigma) al 2% durante 10 minutos, luego se enjuagó con agua destilada y se procedió con el montaje. Los preparados cromosómicos fueron observados al microscopio óptico con un aumento de 100X y 1000X. Se seleccionaron las mejores placas para ser fotografiadas y realizar el conteo cromosómico. Las imágenes de las placas metafásicas fueron capturadas con una cámara digital marca Olympus Camedia C-310 zoom (Fig. 4 A y B).

Resultados

Mortalidad de ovas: El menor promedio de mortalidad se registró en las ovas expuestas a 26ºC, comparado con los tratamientos de 28º y 30ºC, siendo el porcentaje promedio de la mortalidad de ovas de 41.72 % a la temperatura de 26ºC y el mayor porcentaje, 70.5 % para la temperatura de 30ºC ($F=9.783$, $p<0.005$).

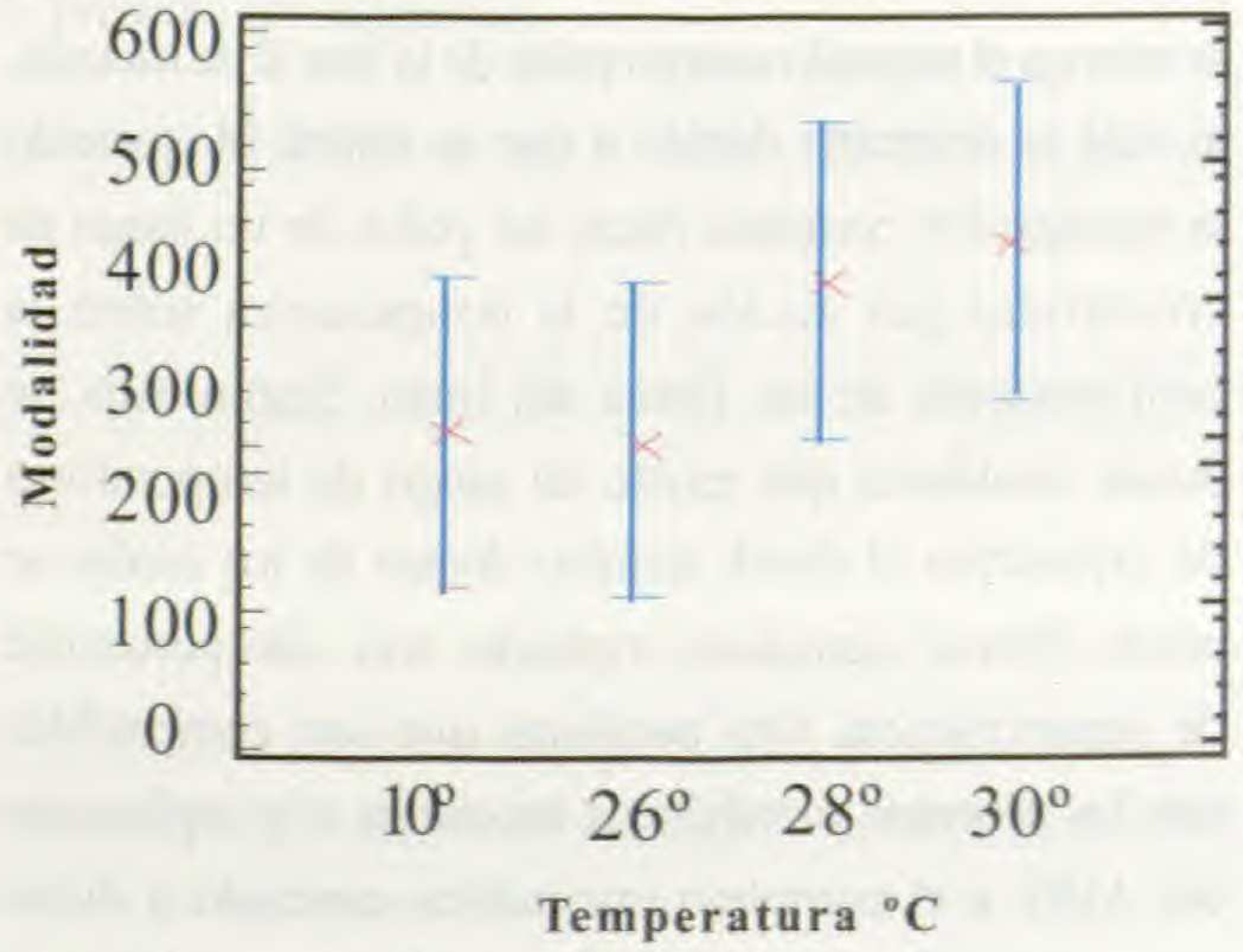

Fig 1. Valores promedios y desviación estandar de la mortalidad de ovas hidratadas a 10 minutos, expuestas al shock térmico de 26, 28 y 30ºC durante 5 minutos en *Oncorhynchus mykiss* «trucha arco iris».

Sobrevivencia larval

El mayor porcentaje de sobrevivencia de las larvas registrados a los 60 días de las ovas expuestas a shock térmico fue a 28 ºC, inclusive mayor que en el control ($F=5.27$; $_p<0.05$) (Tabla 1, Figs. 2 y 3).

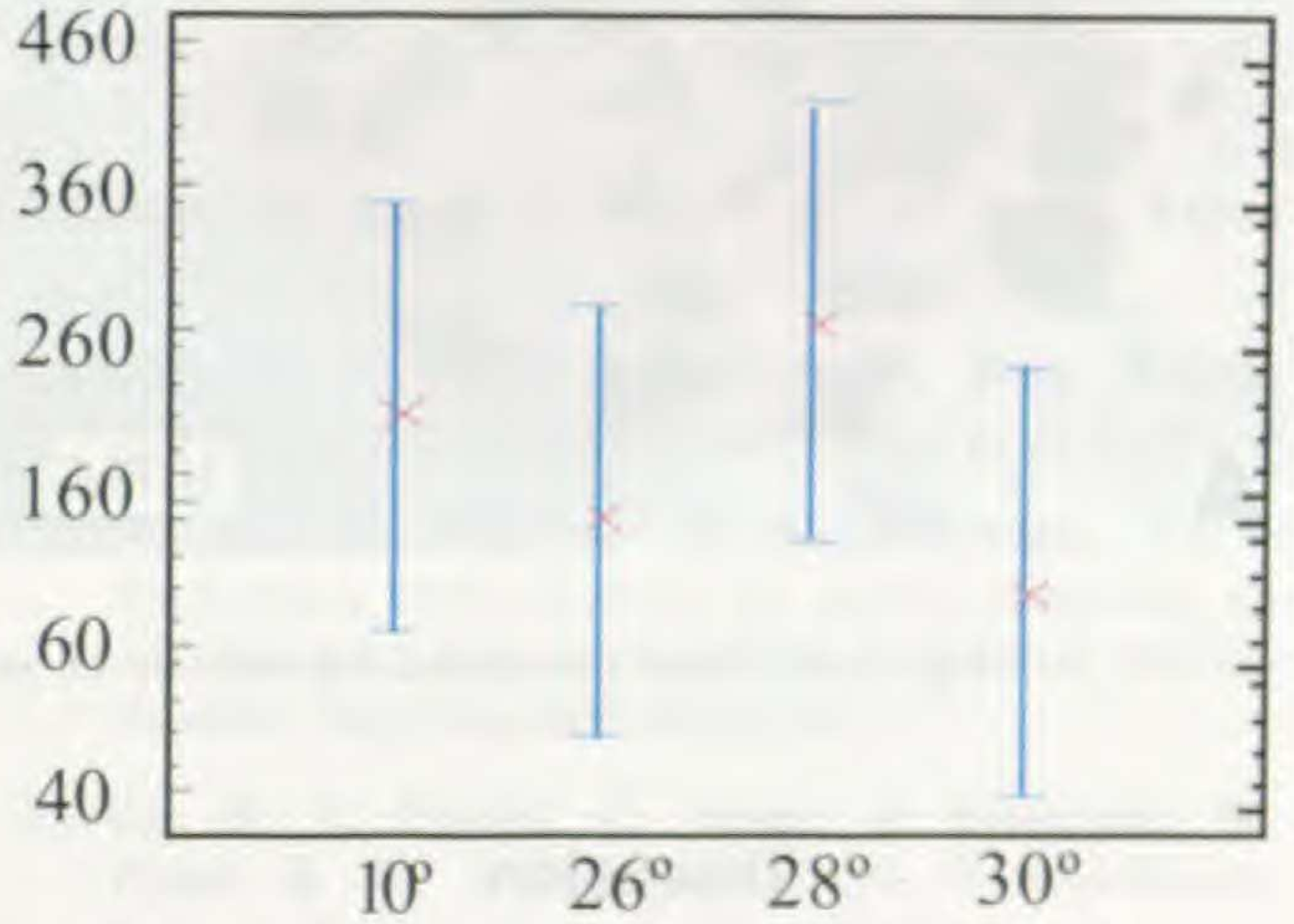

Fig. 2. Valores promedios y desviación estandar de larvas de *Oncorhynchus mykiss* «trucha arco iris» procedentes de las ovas hidratadas durante 10 minutos y 5 minutos de exposición del shock térmico 26, 28 y 30ºC.

T°C	10°C	30°C	26°C	28°C
$\overline{X}$	200.33	278.33	526.00	640.00

P<0.05

Fig. 3. Promedios de sobrevivencia de larvas de *Oncorhynchus mykiss* «trucha arco iris» procedentes de las ovas hidratadas durante 10 minutos y 5 minutos de exposición del shock térmico (Tukey, 95% de confiabilidad)

Tabla 1. Porcentaje de sobrevivencia relativa de larvas de *Oncorhynchus mykiss* «trucha arco iris» a los seis meses procedentes de las ovas hidratadas durante 10 minutos y 5 minutos de exposición del shock térmico.

n	Temperaturas de tratamientos			
	10ºC (control	26ºC	28ºC	30ºC
1	51.52 %	38.21 %	52.5 %	20.1 %
2	71.13 %	38.24 %	43.8 %	20.7 %
3	66.31 %	35.71 %	26.8 %	18.43 %
Promedio	62.99 %	37.39 %	41.03 %	19.74 %

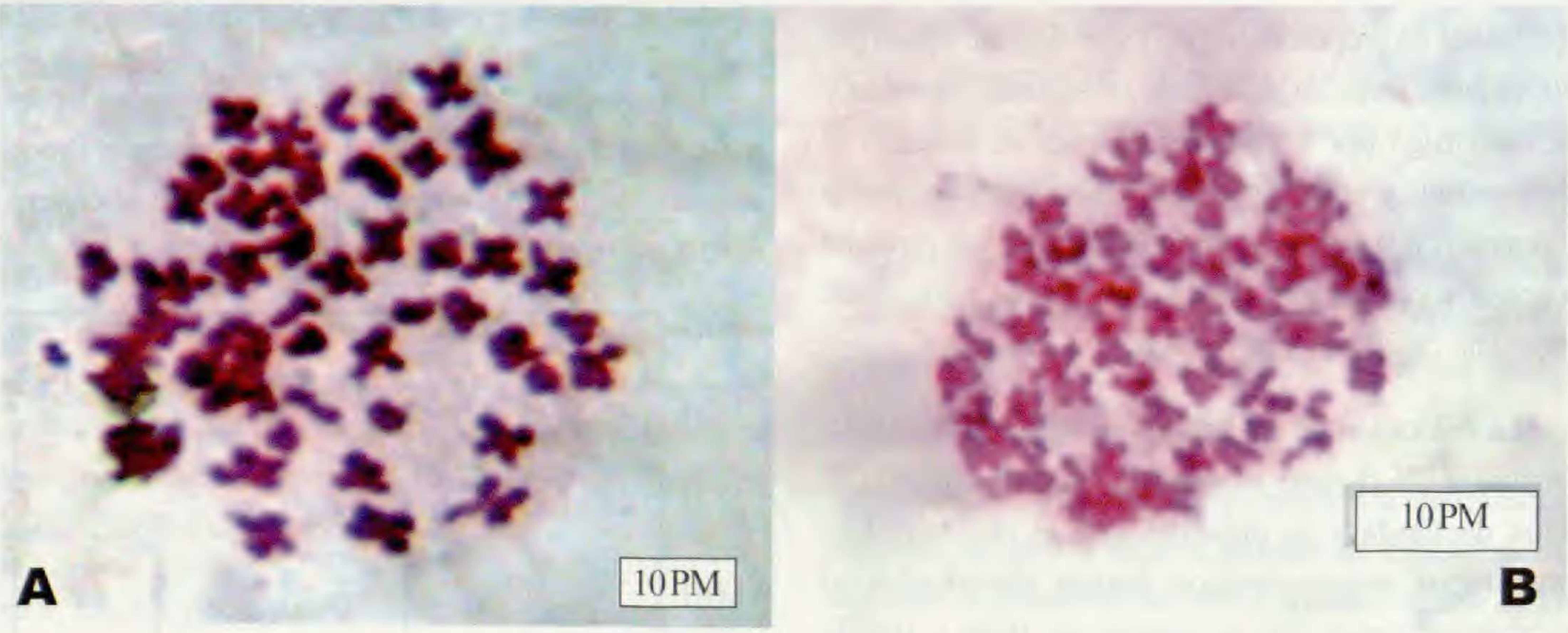

Fig. 4. A. Placa metafásica diploide en *O. mykiss;* B.Placa metafásica triploide en *O. mykiss*

Discusión

Fue evidente la mortalidad de las ovas de *Oncorhynchus mykiss* «trucha arco iris» provocada por las diferentes temperaturas del *shock* térmico durante 5 minutos. Resultados similares fueron obtenidos por Thorgaard (1981), quien encontró un 50% de mortalidad de ovas en trucha con la aplicación del shock térmico a 28ºC.

La supervivencia de triploides en la investigación demuestra que a temperaturas inferiores a 26ºC con una duración de 5 minutos de exposición al shock tG Gérmico se consiguieron menor porcentaje de triploides pero con supervivencia más alta; sin embargo a los 28ºC, al mismo tiempo de exposición, se produce una descendencia mayor de triploides con alto porcentaje (33.39%,41.03%,) de supervivencia. Por lo contrario a los 30ºC se consigue un alto porcentaje de triploides(19.74%) pero con una supervivencia baja; estadísticamente se comprobó que existen diferencias significativas (5.27 $P<0.05$).

Thorgaard *et al.* (1981) y Lincoln & Bye (1984), citado en Blanco (1995), encontraron que la temperatura de 28ºC con 10 minutos de exposición de shock térmico, favorecen a una descendencia con alto porcentaje de triploides entre 90 y 98% de supervivencia; sin embargo al realizarse con niveles térmicos inferiores de 26ºC, con un tiempo de shock térmico de 20 - 25 minutos se consiguen porcentajes menores de triploides pero con una supervivencia mas alta. A la temperatura de 30ºC produce 100% de triploides, pero con supervivencia baja.

Cloud, citado en Pineda *et al.* (2004), nos refiere que a la temperatura de 28ºC con un tiempo de duración de 3 minutos de shock térmico se encontró un alto porcentaje de triploides. Así mismo Thorgaard (1981) denota que se puede obtener triploides si el shock térmico se hace poco tiempo después de la fertilización, de tal forma que se retenga el segundo cuerpo polar de la fase II de meiosis, lo cual es aceptable debido a que se estaría bloqueando la segregación completa hacia los polos de un juego de cromátidas por acción de la temperatura sobre la conformación de las fibras del huso. Según esto, se puede establecer que existe un rango de temperaturas de exposición al shock térmico dentro de los cuales se puede obtener ejemplares triploides con alto porcentaje de supervivencia, tem peraturas que son compatibles con los procesos metabólicos asociados a la replicación del ADN y el complejo enzimático asociado a dicho proceso y al de transcripción, todos asociados a la proliferación celular y procesos iniciales de diferenciación, que sin embargo lleguen a afectar a la formación del huso debido a que se presentan cambios estructurales de los fosfolípidos de la membrana celular por desaturación, elongación y reacción de deacilación

/ reacilación, lo cual explicaría en parte la dificultad para obtener las placas metafisicas y realizar el monitoreo cromosomal correspondiente.

Los resultados de los triploides obtenidos en el presente trabajo son los primeros que se reportan para «trucha arco iris» efectuados en el Centro Piscícola de Motil, lo cual nos permite avizorar que se puede establecer un trabajo rutinario que nos permita incrementar la producción y así proporcionar a la comunidad las bondades de la genética aplicada en la mejora del recurso íctico en agua continentales para así optimizar la producción de nuestra región.

Conclusiones

El menor porcentaje de mortalidad a nivel de ovas fue de 41.72 %.de los parámetros considerados: periodo de incubación, intensidad y duración del tratamiento, sino que además el oxigeno y la temperatura del agua juegan un papel importante para esta experiencia.

Agradecimientos

Expreso mi sincero agradecimiento al Biólogo Pesquero Gilmer Castillo Castillo Director de Acuicultura en la Dirección Regional de Pesquería La Libertad del Ministerio de la Producción por habernos brindado la oportunidad de realizar la presente investigación.

Literatura citada

Ihssen, P; L. Mckay & I. McMillan. 1991. Growth and survival of triploid rainbow trout. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada, 3:13-15.

Lincoln, R. F.; D. Aculstad & D. Grammeltuedt. 1974 Aquaculture, 4:237-297

Lozano, R; Ruiz Rejon C & Ruiz Rejon M. 1985 b. *En*: Genética en Acuicultura. Pp, 215. 246. J

Lozano, R; C. Ruiz Rejon & M. Ruiz Rejon 1987a. Cuad Marisq. Pub. Tecn, R:23-28

Lozano, R; C. Ruiz Rejon & M. Ruiz Rejon. 1987b. *En*: Genética en Acuicultura. Pp, 215- 246. J

Perez, L.; D. Penman & N. Bromage. 1999. Parámetros morfométricos de interés comercial en «Trucha Arco Iris» triploide *Oncorchynchus mykiss*. Aquatic. http://aquatic.unizar.es/.

Rivlin, R; T. Yesaki; C. Biagi; P. Swanson; W. Chan & E. Donaldson. 1994 Extraordinary Salmon Growth Nature, 371:209-210

Tave, D 1993 *In*: Genetics for fish hatchery managers Ed. Van Nostrand. Rein. Hold., New York.

Thoorgaard, G. H. 1986 Ploidy manipulation and performance.Aquaculture, 57:57-64

Thorgaad, G. H.; M. E. Jazwin & A. R. Steir. 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. Transactions of the American Fisheries Society, 110:546-550.

Utter, F; O. Johnson; G. Thorgaard & P. Rabinovitch. 1982. Measurement and potential applications of induced triploidy in «Pacific salmon». Aquaculture. 35:125-135.

Williams, E. E. 1992. The time Course of Temperature Acclimation: rapid, cold-induced alterations in the plasma membrane of rainbow trout hepatocytes